

消栓饮对创伤性肢体深静脉血栓免静脉 VEGF 及受体 VEGFR-1 的影响 *

潘德银¹, 王 勇^{2△}, 李冬春², 黄永松², 胡 拥²

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005)

摘要: 目的 观察消栓饮对兔创伤性肢体深静脉血栓(Deep Venous Thrombosis, DVT)静脉血管内皮细胞生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)及受体 VEGFR-1 表达的影响。方法 将 45 只健康的 SPF 级别雄性新西兰大白兔适应性喂养 1 周后, 随机选取 27 只造模, 将造模成功后的兔, 再随机分为 A、B、C 3 组, 分别为消栓饮组、低分子肝素钠组、模型组, 剩下 18 只大白兔随机分为 D、F 组, 即假手术组、空白组, 每组 9 只。连续用药 1 周, 检测造模前后不同时间点各组兔静脉血管内皮细胞生长因子(VEGF)及受体 VEGFR-1 表达水平。结果 消栓饮组、低分子肝素钠组、模型组 VEGF 及受体 VEGFR-1 表达水平从术后 1d 至 7d 逐渐增高; 消栓饮组、低分子肝素钠组在同时间段与模型组相比, VEGF 及受体 VEGFR-1 表达水平存在差异, 且均有统计学意义($P<0.05$); 而消栓饮组(A 组)与低分子肝素钠组(B 组)在相同时期相比, 指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 在血栓形成段静脉血管壁内皮细胞中, VEGF 及 VEGFR-1 有明显表达, 抗凝治疗能促进该作用的发挥, 消栓饮能促进 VEGF 及 VEGFR-1 的表达, 增加血管的通透性, 能够防治下肢 DVT 形成, 其作用机制可能与低分子肝素钠类似。

关键词: 创伤性肢体深静脉血栓; 消栓饮; 低分子肝素钠; VEGF; VEGFR-1

中图分类号: 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2017)04-0021-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.04.005

深静脉血栓(Deep Venous Thrombosis, DVT)属于下肢静脉回流障碍性疾病, 是血液在深静脉内不正常地凝结, 由液态形式转化为固态, 堵塞静脉管腔, 不但阻碍回流, 而且引起静脉壁的炎症改变, 造成不同程度的急慢性深静脉功能不全。深静脉血栓在骨科大手术后常发生, 我国 DVT 的发生率为 1.8%~2.9%^[1], 临床症状不明显, 但常引发明显的致残率和死亡率, 若治疗不及时, 至少有 1/3 的患者发展成为深静脉血栓形成综合征(post-thrombotic syndrome, PTS)^[2], 而且栓子脱落后, 易出现致命性肺栓塞(PTE)^[3]。接受全髋或全膝置换手术、髋部骨折和骨盆骨折手术的患者发生 PTE 的风险更高^[4]。笔者导师王勇教授依据其 30 多年的临床经验, 自拟方“消栓饮”在临幊上防治下肢深静脉血栓已取得了良好的疗效^[5], 并进行了消栓饮对 DVT 形成的血液流变学^[6]

及深静脉血栓大鼠模型血浆 ET 水平、血栓湿质^[7]的实验研究, 证实了消栓饮能够抑制血小板聚集, 降低血栓形成后血液中 ET 水平。为进一步探究消栓饮作用机制, 设计本实验观察其对 DVT 兔模型肢体深静脉血栓静脉 VEGF 及受体 VEGFR-1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康的新西兰大白兔 45 只, 体质量 2.0~3.0kg, 雄性, 实验动物许可证 SCXK(湘)2013-0005, 质量合格证: No.43608300000256。动物饲养于湖南中医药大学 SPF 级动物实验中心, 保持饲养环境适宜的通风及光照, 生活湿度保持在 40%~70%, 温度控制在 24℃~27℃。

1.2 药物与试剂

①消栓饮组成: 黄芪 50g, 丹参 30g, 白芍药 30g,

* 基金项目: 湖南省自然科学基金(2015JJ2108)

收稿日期: 2017-07-08

作者简介: 潘德银(1990-), 男, 重庆人, 在读硕士研究生, 研究方向: 骨与关节损伤。

△通信作者: 王勇, E-mail: 459831678@qq.com

川牛膝 15g, 当归尾 10g, 桂枝 6g, 大腹皮 15g, 陈皮 10g, 枳壳 10g, 茯苓 10g, 泽泻 10g, 猪苓 10g, 甘草 6g。湖南中医药大学第二附属医院中药房提供, 中药煎药机统一煎制, 每包 120mL, 药物浓度为 1.77g/mL, 封包低温保存备用。②低分子肝素钠注射液, 0.4mL: 4250IUaXA, 昆明积大制药股份有限公司, 国药准字 H20053199, 生产批号: 161008。③戊巴比妥钠(上海哈灵生物科技有限公司 5g/瓶)。④Trizol(ambion 货号: 15596026)。⑤ SYBR Green PCR 试剂盒 (KAPA Biosystems 货号: KM4101)。

1.3 主要仪器

①荧光定量 PCR 仪、PCR 仪 (BIO-RAD); ②BCD-190IM3 超低温冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司); ③高分子石膏绷带(上海曼吉磁生物有限公司); ④冷冻管及冷冻盒(湖南宗衫金桥试剂经营部); ⑤手术器械、无菌巾、缝针、缝线、EDTA 管(湖南中医药大学第二附属医院提供)。

1.4 造模及分组

1.4.1 造模

实验动物饲养 1 周后, 参照张春强等^[8] 造模方法, 具体如下: 造模前 8h 禁食禁水, 采用 2% 戊巴比妥钠(40mg/kg)耳缘静脉注射麻醉成功后, 仰卧位, 手术区备皮、消毒、铺巾, 沿左腹股沟内侧股静脉走向做长约 3cm 的纵行切口, 分离筋膜肌肉, 显露出股动脉、股神经及股静脉, 将位于内侧的股静脉分离出来, 采用同厂家同批次的 12 号蚊式钳分 3 处不同地方(相隔 5mm)各钳夹 1 次, 力量为血管扣紧 1 个扣, 每处时间持续约 3s, 然后用 3-0 丝线逐层缝合。术后不予以抗凝及抗生素治疗, 包扎伤口后采用髋人字形石膏固定制动。假手术组取相同位置, 作长度相同的切口, 分离暴露出股静脉后, 不行钳夹, 待与手术组相同时间后, 用 3-0 丝线逐层缝合闭伤口, 维持髋人字形石膏固定。术后 24h, 对家兔进行麻醉消毒铺单, 按原切口显露股静脉, 直接肉眼观察股静脉, 据相关的文献及本实验前期的实验^[9-10]表明, 股静脉管腔变粗, 色泽变暗, 血栓填充于管腔, 呈现出紫黑色, 则造模成功。本次试验 27 只大白兔股静脉均有血栓形成, 其中 5 只形成少量的血栓, 并未予以剔除。

1.4.2 实验分组

SPF 级大白兔 45 只, 体质量 2.0~3.0kg, 雄性, 按

照随机数字表随机选取 27 只造模, 造模成功后随机分为 A、B、C 3 组, 分别为消栓饮组、低分子肝素钠组、模型组, 剩余 18 只按随机数字表法均分为假手术组及空白组, 编号为 D、E 组, 每组 9 只。

1.5 实验给药

根据人与动物体表面积换算公式: $D_{兔} = D_{人} \times R_{兔}/R_{人}$ (D 是给药剂量, R 为动物与人体表面积比值系数), 计算出 A 组中药灌胃量为 9.9g/kg/d, B 组以皮下注射低分子肝素钠, 每支原液体积 0.4mL (4250IUaXA), 用 40mL 5% 葡萄糖稀释, 每毫升含低分子肝素钠约 100IU, 按 $40IU \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, 经腹壁皮下注射给药。C、D、E 3 组予以同中药剂量生理盐水灌胃, 每日 1 次。各组均从造模后第 2 天开始给药, 时间为 7d。

1.6 指标检测

各组于分组后第 1、3、7 天药物治疗 4h 后每次随机选取 3 只大白兔进行股静脉样本采集, 切取长约 3cm 的股静脉及其属支, 有血栓的除去血栓, 用生理盐水对血管冲洗, 然后迅速放入冷冻管内置于液氮中保存备用, 采用 Real-time RCP 法检测股静脉 VEGF 及受体 VEGFR-1 的相对表达量。数据处理, 等待反应结束后, 运用全自动荧光定量 PCR 仪中自带 qbase plus 软件计算出 Ct 值, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 结果形式进行分析。

具体如下:

$$\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组目的基因}) - \Delta Ct(\text{对照组目的基因})$$

1.7 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计分析软件, 对数据进行分析, 实验中数据采取均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式; 符合正态性分布及方差齐性检验($P > 0.05$)时, 选 LSD 检验对组间进行比较分析, 当 $P < 0.05$, 说明其差异具有统计学意义。各组自身前后对比采用 t 检验, $P < 0.05$ 时, 其差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大白兔一般状况比较

D、F 组大白兔在整个实验期间, 进食正常、反应快, 毛色纯白, 且肢体未出现肿胀, A、B、C 组精神萎靡, 反应迟缓, 呼吸频率加快, 左后肢肿胀, 皮肤颜色发暗, 局部肤温增高, 毛细血管反应欠佳, 活动较健

侧笨拙。A、B组给药3d后患肢肿胀程度、肤色、肤温、末梢血运、活动度均出现好转,用药7d后上述症状得到改善,说明消栓饮及低分子肝素钠均能改善DVT兔模型的一般状况及局部血液循环。

2.2 各组VEGFR-1表达水平比较

术后同时期D、E组VEGFR-1水平相比差异无统计学意义($P>0.05$),说明假手术操作本身不会引起VEGFR-1表达;术后1d,A、B、C组的VEGFR-1含量均明显高于D组,差异有统计学意义($P<0.05$),说明血管壁的破坏、血栓形成能引起VEGFR-1表达增高;A、B与C在同时期相比,差异具有统计学意义($P<0.05$);提示消栓饮与低分子肝素钠均能够促进VEGFR-1表达,同时A、B组术后7d与术后1d、术后3d相比,VEGFR-1表达差异具有统计学意义;A、B两组在同时期相比,差异无统计学意义($P>0.05$),提示消栓饮与低分子肝素钠促进VEGFR-1的表达作用效应相同。见表1。

表1 各组静脉壁VEGFR-1相对表达量(倍数)的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	治疗1d	治疗3d	治疗7d
空白组	0.412±0.056	0.465±0.066	0.512±0.037
假手术组	0.446±0.052	0.480±0.416	0.545±0.075
模型组	0.527±0.031•	0.577±0.031•	0.678±0.083•
低分子肝素钠组	0.697±0.007•▲▲	0.728±0.201•▲▲	0.870±0.076•▲▲△
消栓饮组	0.632±0.045•▲	0.678±0.028•▲	0.815±0.071•▲△

注:与假手术组比较,• $P<0.05$;与模型组相比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;各组治疗前后比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

2.3 各组VEGF表达水平比较

术后同时期D、E组VEGF水平相比差异无统计学意义($P>0.05$),说明假手术操作本身不会引起VEGF表达,同时在D组术后1、3、7天之间对比差异无统计学意义($P>0.05$);术后1d,A、B、C组的VEGF表达均明显高于D组,差异有统计学意义($P<0.05$),说明血管壁的损伤、血栓状态能引起VEGF表达增高;A、B与C在同时期相比,差异有统计学意义($P<0.01$);A、B、C3组VEGF水平术后1d至术后7d逐渐增高,同时A、B组VEGF表达水平术后7d与术后1d相比差异均有统计学意义,A、B两组在同时期相比,差异无统计学意义($P>0.05$),提示消栓饮与低分子肝素钠均能够促进VEGF表达,且作用效果相当。见表2。

表2 各组静脉壁VEGF相对表达量(倍数)的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	治疗1d	治疗3d	治疗7d
空白组	0.471±0.097	0.536±0.053	0.635±0.032
假手术组	0.557±0.115	0.643±0.047	0.726±0.093
模型组	0.721±0.046•	0.811±0.046•	0.896±0.039•
低分子肝素钠组	1.027±0.069•▲▲	1.125±0.119•▲▲	1.157±0.048•▲▲△
消栓饮组	0.941±0.039•▲▲	1.030±0.045•▲▲△	1.124±0.042•▲▲△

注:与假手术组比较,• $P<0.05$;与模型组相比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;各组治疗前后比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

3 讨论

本实验造模法,利用蚊氏钳直接钳夹股静脉,模拟临床骨科手术静脉的损伤,并采用髋人字形石膏固定制动,建立了DVT形成的部分条件,有效的建立急性创伤性肢体深静脉血栓形成兔模型,反映了临床DVT的变化过程。

1856年德国著名医学家Virchow提出血栓形成的3大因素:血管内膜损伤、静脉血流淤滞及血液高凝状态。可以看出静脉壁的损伤是血栓形成的重要条件之一。正常静脉内皮存在少量的血管内皮细胞生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor VEGF),具有抗血栓形成的功能。血栓形成时,VEGF通过和两种高亲和力受体,即VEGFR-1和VEGFR-2结合,能特异性作用于血管内皮细胞,并促进血管内皮细胞增值分化,有效的促进新血管形成,增加血管的通透性。VEGFR-1属于酪氨酸激酶受体家族第三亚型,经过研究表明VEGFR-1具有血管原的作用,能促进血管内皮细胞有丝分裂,能促进内皮细胞发挥其抗血栓形成的功能^[1]。VEGF与VEGFR-1特异性结合,促进内皮细胞生长和新血管形成,充分发挥正常血管壁的生物性效应,通过提高血管的通透性,加速炎性渗透,抑制血管内炎症因子的释放,有效的防治血栓的形成。故对血管内皮细胞生长因子及其受体的研究受到了广大学者的重视。

从下肢深静脉血栓形成的临床表现来看,可归属于中医学“瘀血流注”“肿胀”“脉痹”等病证范畴,导师认为,本病主要由骨折创伤、久卧制动等病因致脉络损伤,气滞瘀血阻络,脉痹不通为本病之机,而“瘀”贯穿本病病程始终,中医学认为,气能生血,气能摄血,气能行血,调畅气机,瘀血则散,气盛,既能化生血液,又使血液不妄行,固摄血液行于脉络中。

因此,对下肢深静脉血栓的治疗,导师认为当以益气活血、化瘀通络为主,兼以利湿消肿。处方中重用黄芪以补气,以促血行,为君药;桂枝温经通脉,芍药养血和营,两药均为臣药;当归尾、牛膝、丹参等破血活血、通经利脉;茯苓、猪苓、泽泻等则利水渗湿消肿;陈皮、枳壳等行气消胀除满。全方配伍严谨,扶正祛邪,标本兼顾,气血和,经脉通,则病除^[12]。

低分子肝素钠目前已经广泛运用于临床,对于骨科,严重的下肢创伤或者髋部骨折围手术期及术后,在抗凝药物上,首选低分子肝素^[13],抗凝治疗有抗血小板聚集的作用,能扩张血管,改善血液循环^[14]。低分子肝素可以提高 VEGFR-1 及局部的生长因子的浓度,调节促血管生长因子与其酪氨酸激酶受体的结合^[15~16],促进血管的生成。通过与消栓饮对比,探究消栓饮对 DVT 形成的防治疗效。

从本次实验结果表明,术后 1d,消栓饮组、低分子肝素钠组、模型组的 VEGF 及受体 VEGFR-1 表达均明显高于 D 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),说明血管壁的损伤、血栓形成状态能引起 VEGF 及受体 VEGFR-1 表达,这可能是机体的内源性保护作用,而药物治疗能促进该作用的发挥。从术后 1d 到 7d,两者表达逐渐增加,表明在血栓形成后 VEGF 及 VEGFR-1 能对血栓机化或溶解起到一定的良性作用。本实验的消栓饮组、低分子肝素钠组 VEGF 及 VEGFR-1 表达较模型组又有显著提高 ($P<0.05$),说明消栓饮、低分子肝素钠能促进 VEGF 及 VEGFR-1 的表达,可以抑制血栓的形成,与低分子肝素钠组在同时期相比,各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$),提示消栓饮与低分子肝素在改善血管内皮细胞,防治下肢 DVT 形成的作用效应相似。

综上,通过本实验研究,证实了消栓饮防治 DVT 的有效性,通过促进血栓形成后 VEGF 及 VEGFR-1 的表达,改善创伤后血管内皮细胞的损伤,从而抑制深静脉血栓形成。

参考文献:

- [1] 中华医学会骨科学分会. 中国骨科大手术静脉血栓栓塞症预防指南[J]. 中华骨科杂志, 2016, 36(2): 65~71.
- [2] 王深明, 武日东. 下肢深静脉血栓形成治疗指南与实践[J]. 中国实用外科杂志, 2015, 35(12): 1264~1266.
- [3] 蔡立民, 桑传兰, 谭志超, 等. 活血灵片对创伤性肢体深静脉血栓模型兔的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(4): 515~518.
- [4] Dobesh PP. Evidence for extended prophylaxis in the setting of orthopedic surgery [J]. Pharmacotherapy, 2004, 24(7Pt2): 73S~81S.
- [5] 李冬春, 王勇. 消栓饮预防人工髋关节置换术后深静脉血栓形成的临床观察 [J]. 中国医疗前沿, 2012, 7(4): 41.
- [6] 肖清明, 王勇, 谭胜平, 等. 消栓饮对兔下肢深静脉血栓形成血液流变学影响实验研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(5): 39~41.
- [7] 张栋, 高山, 汪能, 等. 消栓饮对创伤性肢体深静脉血栓大鼠血浆 ET 水平及血栓湿质的影响 [J]. 中医药导报, 2016, 22(7): 39~41.
- [8] 张春强, 黄河, 赵学凌, 等. 两种创伤性深静脉血栓大鼠模型中炎症相关基因的表达研究 [J]. 生物医学工程研究, 2007, 26(1): 66~70.
- [9] 汪能, 王勇, 张栋, 等. 消栓饮对创伤性肢体深静脉血栓大鼠血浆 TXB2/6-Keto-PGF1 α 的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(5): 21~23.
- [10] 徐军. ELISA 检测 D-Dimer、APA、TAT 探讨恒古骨伤愈合剂治疗兔 TDVT 分子机理的实验研究 [D]. 昆明医学院, 2009.
- [11] Roskoski R Jr. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 375(3): 287~291.
- [12] 简功辉, 李冬春, 黄永松, 等. 王勇教授治疗创伤性深静脉血栓的学术经验 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(5): 809~811.
- [13] 周玉杰, 杨士伟. 美国胸科医师协会第九版抗栓治疗及血栓预防指南静脉血栓栓塞性疾病最新进展 [J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2013, 5(3): 33~37.
- [14] 罗继红, 张世国, 胡永春, 等. 髋部及下肢骨折后深静脉血栓形成治疗观察 [J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(12): 832~833.
- [15] 韩继超, 崔慧斐. 肝素在治疗性血管生成中的作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(2): 118~120.
- [16] 张洪鑫, 杨柳, 段小军, 等. 低分子肝素对 VEGF 作用下兔骨髓 MSCs 促增殖能力的影响 [J]. 四川医学, 2006, 27(4): 331~333.

(编辑:徐建平)

The Effects of Xiaoshuan Decoction on the VEGF and VEGFR-1 in Traumatic Deep Vein Thrombosis in Model Rabbits

PAN Deyin¹, WANG Yong², LI Dongchun², HUANG Yongsong², HU Yong²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the effects of Xiaoshuan Decoction(XSD) on the VEGF and VEGFR-1 in Traumatic Deep Vein Thrombosis in Model Rabbits. **Methods** 45 SPF male New Zealand white rabbits were adaptively fed for one week later, Randomly selected 27 rabbits. The successfully established rabbits were randomly divided into 3 groups: XSD group (group A), low molecular weight heparin(LMWH) group(group B), model control group(group C), the remaining 18 rabbits were randomly divided into D and F groups, namely the sham operation group, the blank control group,9 of each group. Each group received continuous administration for one week, and the expression level of VEGF and VEGFR-1 was tested at different time points. **Results** XSD group, LMWH group and model control group showed the expression level of VEGF and VEGFR-1 was increased gradually by 1d to 7d. XSD group and LMWH group showed higher level of VEGF and VEGFR-1 than the model control group over the same period, with statistical significance ($P < 0.05$). The difference on VEGF and VEGFR-1 between the XSD group and LMWH group showed no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** In deep vein thrombosis, VEGF and VEGFR-1 are clearly expressed, and anticoagulant therapy can promote the function, XSD can promote the expression of VEGF and VEGFR-1, increases the permeability of blood vessels, and can effectively prevent the formation of lower extremity DVT. Its action mechanism may be similar to LMWH.

KEY WORDS: traumatic deep vein thrombosis; Xiaoshuan decoction; LMWH; VEGF; VEGFR-1

CNKI 研制成功《医院科研成果统计分析与评价数据库》,日前通过专家鉴定

2017年7月20日,同方知网(CNKI)中国科学文献计量评价研究中心研发的《医院科研成果统计分析与评价数据库》召开了专家鉴定会。来自卫生和医疗主管部门、医院科研处、学协会等18个单位的20位专家参会,并对该项成果给予高度评价,认为其达到国内领先水平。

该数据库统计了全国11863家医院(包括1647家三级医院、6357家二级医院)及其200万名学者近10年的科研产出成果数,并对其学术影响力进行了评价。统计的科研成果类型包括国内期刊发文、SCI论文、国内会议和ISTP国际会议论文,以及专利、基金和奖励等。除了统计成果数量以外,该数据库还统计了期刊论文的被引频次、下载频次等影响力指标,并发布了医院和学者的h指数、综合指数等综合评价指标。为了满足医院各科室及细分学科领域的评价需求,数据库按临床科室情况设计了28个一级学科进行分类评价。

该数据库为医院科研绩效评价与管理提供了丰富、全面的统计数据。基于“科研结果管理”的理念,该数据库发布了大量客观事实数据。主要用途可以概括为:首先,支持医院的学科发展水平评价。既能纵向比较各年各学科发展趋势,又能横向与全国同学科医院发展水平进行对比分析,从而知彼知己,找准医院学科建设的重点方向。其次,支持专家学者评价。该数据库对医院科研人员近10年的科研产出和学术影响力进行了全面统计分析,方便医院了解和管理本院各科室学者,也方便评估和寻找学科带头人和专家。第三,支持学者成果的快捷汇总和统计,把科研人员从整理自己成果的繁琐工作中解放出来。只需轻轻一点,即可轻松完成了科研成果及影响力数据的统计和导出!

《医院科研成果统计分析与评价数据库》网址:<http://www.pj.cnki.net/>,欢迎咨询、订购。咨询电话:010-82710850 82895056 转 8599, Email: aspt@cnki.net。